

---

## Mini Review

---

### ミドリゾウリムシと共生クロレラの細胞内共生成立機構

児玉有紀<sup>1,2\*</sup>・藤島政博<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 山口大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup> 日本学術振興会特別研究員 (DC2)

<sup>1</sup> 〒753-8512 山口県山口市吉田1677-1

### Mechanism of establishment of endosymbiosis between the ciliate *Paramecium bursaria* and the symbiotic alga *Chlorella* species

Yuuki KODAMA\* and Masahiro FUJISHIMA

Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753-8512, Japan

#### SUMMARY

Each symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* is enclosed in a perialgal vacuole derived from the host digestive vacuole, thereby the alga is protected from digestion by the host lysosomal fusion. Algae-free paramecia and isolated symbiotic algae from algae-bearing cells still have an ability to live each other. Algae-free cells can be easily reinfected with the algae isolated from algae-bearing cells by ingestion into digestive vacuoles. The symbiotic associations of these eukaryotic cells are excellent models for studying the evolution of eukaryotic cells through the secondary endosymbiosis between protozoa and algae. However, the detailed algal infection process had been unclear. Using pulse-label of the alga-free paramecia with the isolated symbiotic algae and chase method, we clarified the timing of the algal infection process to the algae-free paramecia. Furthermore, four important cytological events needed to establish endosymbiosis were found: (1) some algae show resistance to the host lysosomal enzymes in the host digestive vacuole, (2) algal escape from the host digestive vacuole by budding of the digestive vacuole membrane, (3) differentiation of the host digestive vacuoles wrapping the green algae into the perialgal vacuole membrane to protect from lysosomal fusion, and (4) an attachment of the green algae wrapped by the perialgal membrane to beneath the host cell membrane. This algal infection process is different from those so far known infection processes in other symbiotic and parasitic organisms.

---

\*Corresponding author  
Tel/Fax: +81-83-933-5721  
E-mail: yuuki5667@yahoo.co.jp  
(Received: 24 January 2008)

† 現所属先住所: 〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1  
筑波大学大学院生命環境科学研究科 井上勲研究室  
(日本学術振興会特別研究員PD)

## はじめに

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は *Paramecium* 属の中では唯一クロレラを共生させる能力を持っている。ミドリゾウリムシの細胞質内には約700個のクロレラが共生しており (図1A)、各クロレラは宿主のリソソームが融合しないPerialgal vacuole (PV) 膜に包まれ、宿主の分裂時には娘細胞に分配される。共生クロレラを持つ原生動物は他にも多数報告され (原生物情報サーバ、細胞内共生の項目を参照)、ヒドラやカイメン等の多細胞生物でも報告されている (Reisser, 1992)。

クロレラは宿主に酸素やマルトースなどの光合成産物を与える (Brown and Nielsen, 1974; Pado, 1967)。一方、宿主はクロレラにCO<sub>2</sub>やNH<sub>3</sub>、光合成活性上昇因子などを与える (Reisser, 1986; Albers et al., 1982; Albers and Wiessner, 1985; Kamako and Imamura, 2006)。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生の関係であるが、両者はまだ単独で増殖できる。ミドリゾウリムシを恒暗条件下で培養したり、タンパク質合成阻害剤や光合成阻害剤で処理するとクロレラを除去できる (図1B) (Karakashian, 1963; Reisser, 1976; Weis, 1984)。このクロレラ除去細胞とミドリゾウリムシから単離した共生クロレラを混合すると、細胞口から取り込まれたクロレラの一部が食胞を経由して数時間後には容易に細胞内共生を再開する (Karakashian, 1975)。ミドリゾウリムシは培養が容易で共生不能突然変異体も得られ (Tonooka and Wata-

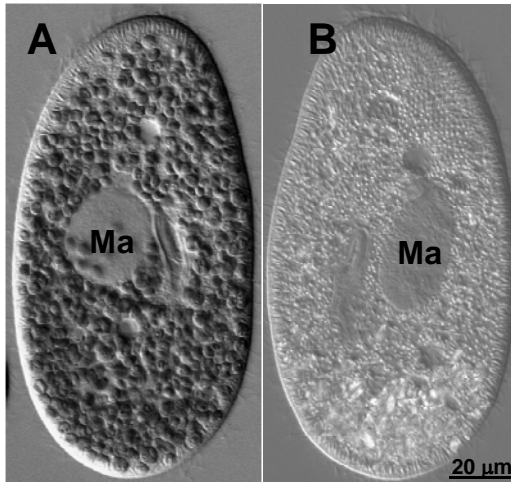


図1. A、ミドリゾウリムシ。B、Aを暗闇で培養することによってクロレラを除去した白いミドリゾウリムシ。Ma = 大核。

nabe, 2002)、細胞が透明であるため感染過程の観察が容易でマイクロインジェクションも可能である点から二次共生成立機構解明のモデル材料になると考えられてきた。しかし、クロレラ除去細胞と共生クロレラを混合すると、短時間で多数のクロレラが食胞に取り込まれるため観察が困難で、クロレラの感染ルートの詳細は不明瞭なままであった。

## パルスラベルとチェイスの方法

我々はクロレラ除去細胞に一定数のクロレラを1.5分だけパルス的に与え、その後チェイスして食胞内に取り込まれたクロレラを経時的に追跡にする最適条件を確立し、クロレラの感染ルートの全容を明らかにした (Kodama and Fujishima, 2005, 2007; Kodama et al., 2007)。

## ミドリゾウリムシの食胞の分化

*P. multimicronucleatum*の食胞形成の詳細な研究はハワイ大学のFokとAllen等によって行われている (Fok and Allen, 1988)。ミドリゾウリムシの食胞形成に関

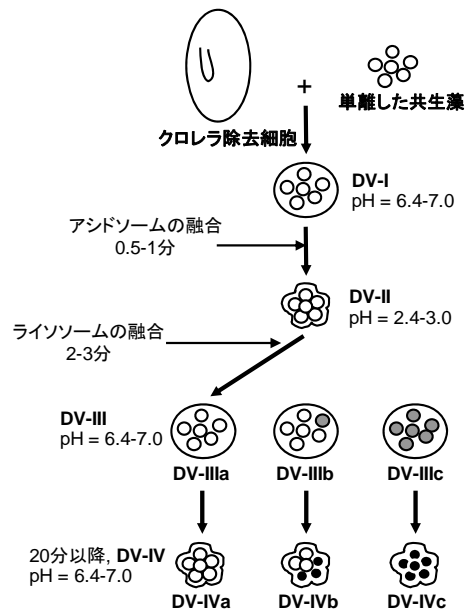


図2. ミドリゾウリムシの食胞の分化。詳細は本文参照。白丸は緑色のクロレラを、灰丸は消化されて黄色くなったクロレラを、黒丸は消化されて茶色くなったクロレラを示す。Kodama et al. (2007) を改変して転載。

する研究報告は無く、*P. multimicronucleatum*と同じであるされていた (Meier and Wiessner, 1989)。しかし、パルスラベルとチェイスを行い、ミドリゾウリムシの食胞の分化過程を観察したところ、*P. multimicronucleatum*とは大きく異なることが明らかになった。図2に示すように形態と出現時期を基にミドリゾウリムシの食胞の分化を8時期に分類し、その出現時間を明らかにした。

クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合後、0.5分以内にはDV-Iが観察される。DV-Iの食胞膜は光学顕微鏡で観察でき、食胞は球形である。0.5–1.0分後には食胞膜が収縮したDV-IIに分化する。2.0–3.0分後には、再び食胞膜が膨潤したDV-IIIに分化する。DV-IIIは食胞内の全てのクロレラが緑色のDV-IIIa、消化途中の黄色く退色したクロレラと緑色のクロレラの双方を包むDV-IIIb、食胞内の全てのクロレラが黄色のDV-IIIcの3つのサブステージに分けられる。20分以降は食胞膜が再び収縮したDV-IVに分化する。DV-IVもDV-IIIと同様にDV-IVa、DV-IVb、DV-IVcに分けられる。DV-IVではクロレラの消化がさらに進む。pH指示薬で標識した酵母菌を取り込ませ、酵母菌の色の変化で食胞内pHを測定した結果、DV-IIでアシドソームが融合し、食胞の酸性化が起きることが分かった。Gomori染色 (Gomori, 1952) で酸性フォスファターゼ (AcPase) 活性の有無を調べると、DV-III以降で活性が検出されることから、DV-IIIでリソソームが融合することが分かった (Kodama and Fujishima, 2005, 2006a)。

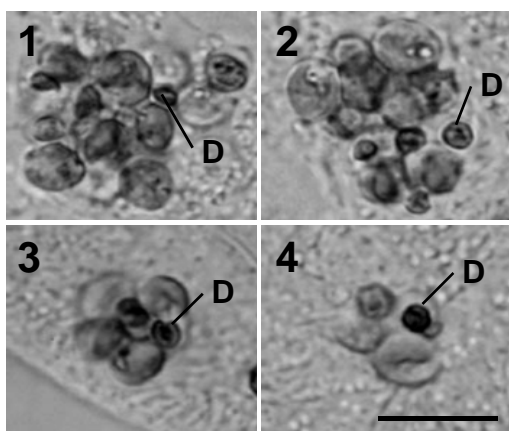


図3. 消化されたクロレラ (D、直径が小さく色が濃いもの) と消化を免れた緑色のクロレラが共存する食胞DV-IVb。細胞内共生を成立させるクロレラはDV-IVbから出現する。消化クロレラと消化を免れたクロレラの食胞内での位置に局在性は無く、各DV-IVbの大きさも様々である。Bar = 10  $\mu$ m。

#### クロレラの感染過程と細胞内共生成立のために必要な4つの現象

最終的に細胞内共生を成立させるクロレラがどの食胞から脱出して細胞質に出現するのかとそのタイミングを明らかにした。その結果、クロレラが辿る感染過程には次に述べる4つの重要な現象が存在することが明らかになった。

第1は、一部のクロレラが宿主食胞内で一時的にリソソーム酵素耐性になる現象である。細胞内共生を成立させるクロレラは、混合後30以降に消化されたクロレラ (図3、D) と消化を免れた緑色のクロレラを包むDV-IVbから細胞質に脱出することが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2005)。クロレラが一時的にリソソーム耐性を獲得するこの現象は、クロレラの細胞周期、宿主食胞内の位置、クロレラの種類、クロレラと宿主のタンパク質合成活性の有無とは無関係であった (Kodama et al., 2007)。一部のクロレラが一次的にリソソーム耐性を獲得する理由はまだ明らかになっていない。

第2は、クロレラが食胞膜の出芽で細胞質に脱出する現象である。食胞からの脱出は、消化を免れたクロレラだけでなく (図4、矢尻)、消化されたクロレラ (図4、矢印) も可能である。この脱出は、煮沸したクロレラや酵母菌、ミドリゾウリムシに感染不能なクロレラでも可能であるが、最終的には消化または排出される。一方、直径0.81  $\mu$ mのラテックスビーズ、宿主の餌のバクテリア、墨汁は脱出が不可能であった。また、食胞からの脱出は、宿主とクロレラ双方のタンパク質合成を必要としない (Kodama and Fu-

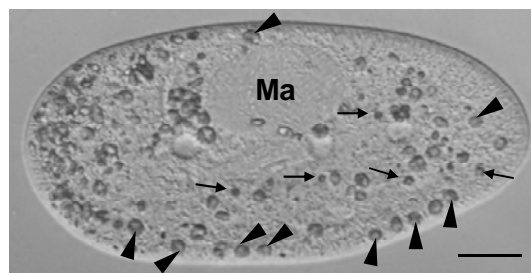


図4. クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混同してから3時間後の細胞。クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合した直後は、クロレラは食胞内にパッキングされている。クロレラと混合してから30分後にはクロレラの宿主食胞からの脱出が始まる。食胞からの脱出は消化を免れた緑色のクロレラ (矢尻) だけではなく、消化された茶色いクロレラ (矢印) も可能である。Bar = 10  $\mu$ m、Ma = 大核。Kodama and Fujishima (2005)より転載。

jishima, 2005, 2006b)。

第3は、クロレラを包む食胞膜がリソソーム融合を阻止するPV膜に分化する現象である。DV-III以降の食胞内と、クロレラと混合後30分以降の出芽部分の食胞膜とクロレラの細胞壁の間にはAcPase活性が検出された。混合後45–60分には、細胞質に脱出した緑色のクロレラが宿主の細胞表層直下に接着する現象が観察される。このクロレラは宿主の原形質流動によって移動することはない。このクロレラを包む膜の内側にはAcPase活性は検出されなかった。つまり、食胞膜からPV膜への分化は、DV-IVbからの脱出直後から宿主の細胞表層直下に接着する間に起きることが明らかになった (Kodama and Fujishima, 2006a)。

第4に、PV膜に包まれたクロレラが宿主細胞表層直下に接着する現象である。ミドリゾウリムシの共生クロレラや感染可能な自由生活クロレラ (*C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Parachlorella kessleri*の3種類) は食胞脱出後、宿主の細胞表層直下に接着する(図5B、矢印)。一方、感染不能なクロレラ (*C. ellipsoidea*, *C. saccharophila*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. zofingiensis*, *C. protothecoides*) は、食胞内で消化を免れ、宿主細胞質へ脱出できるが、細胞表層直下に接着はできず(図5D)、最終的に細胞肛門から排出された。これらの結果は、宿主細胞表層直下への接着が二次共生成立の最終段階として必須な現象であることを示唆している。さらに、クロレラの感染能の有無は、細胞壁の糖組成で決まると報告されていたが (Takeda et al., 1998)、糖分解酵素や蛍光標識レクチンを用いた実験結果から糖組成とは無関係であることが証明された (Kodama and Fujishima, 2007)。

### クロレラの宿主リソソーム攻撃からのエスケープ機構

細胞内共生生物が宿主細胞内に侵入して安定して維持されるためには、第一に宿主リソソーム攻撃を回避する必要がある。この方法には、*Yersinia*属細菌の様に、マクロファージの機能を阻害し食食に抵抗する例、*Listeria*属と*Holospira*属細菌の様に、ファゴソーム膜から細胞質へ脱出し、リソソームによる殺菌を回避する例、結核菌、*Salmonella*属、*Legionella*属、*Brucella*属細菌の様にファゴソームとリソソームとの融合を阻害する例がある (Iwatani et al., 2005; 山本・高屋, 2006)。クロレラはリソソーム融合前に食胞から脱出すると考えられていたが (Meier and Wiessner, 1989)、我々は、細胞内共生に成功するクロレラは、アシドソームとリソソームが融合した食胞内で一次的にリソソーム酵素耐性を獲得し、その後リソソームが融合しないPV膜に包まれて増殖することを明らかにした。クロレラの宿主リソソーム攻撃からのエスケープ機構は、これまでに報告されたどの寄生性細菌や共生細菌とも異なる新規なものである (Kodama and Fujishima, 2005)。

### 今後の展開

筆者らがミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立機構の研究を始めて今年で5年になる。これまでは細胞生物学的な手法でクロレラの感染過程の観察を中心に行ってきた。今後は筆者らが発見した細胞内共生成立のために必要な4現象を分子レベルで解

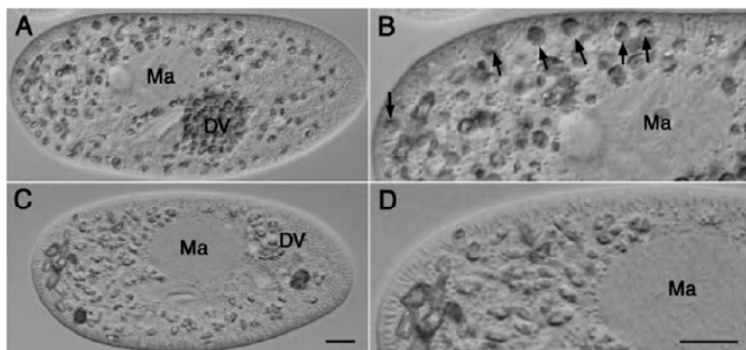


図5. A、クロレラ除去細胞と単離した共生クロレラを混合してから3時間後の細胞。B、Aの左上部の拡大図。宿主の細胞表層直下にクロレラが定着している(矢印)。C、ミドリゾウリムシに共生できない自由生活クロレラ (*C. saccharophila*, strain C-169) を与えてから3時間後の細胞。D、Cの左上部の拡大図。この種のクロレラは宿主細胞表層直下に定着できずに消失し、細胞内共生を成立させることができない。Bar = 10  $\mu$ m, Ma = 大核。Kodama and Fujishima (2007)より転載。

明し、二次共生成立のために必要な諸現象の分子機構を明らかにしたい。この研究が進めば、任意の組み合わせで細胞内共生を人為的に誘導し、有用細胞をつくり出す画期的な技術開発が可能になることが期待される。この技術の開発は、究極の省エネ対策としての食料不足の改善、CO<sub>2</sub>の減少、O<sub>2</sub>の増加、生存に不適な各種ストレス環境でも生育できる生物の作成等に貢献できることが期待される。さらに、この研究で得られた情報は、共生クロレラを持つ様々な共生系や他の動物細胞と藻類との共生系の維持の解明と生態系の維持にも役立つことが期待できる。

## 謝辞

本研究は、児玉への日本学術振興会特別研究員奨励費と、藤島への科学研究費補助金基盤研究(B)海外(No. 17405020)の支援で行われた。

## 引用文献

- Albers, D. and Wiessner, W. (1985) Nitrogen nutrition of endosymbiotic *Chlorella* spec. *Endocyt. C. Res.*, 55–64.
- Albers, D., Reisser, W. and Wiessner, W. (1982) Studies on the nitrogen supply of endosymbiotic chlorellae in green *Paramecium bursaria*. *Plant Sci. Lett.*, 25, 85–90.
- Brown, J.A. and Nielsen, P.J. (1974) Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 21, 569–570.
- Fok, A.K. and Allen, R.D. (1988) The lysosome system. *In: Paramecium*. Görtz, H.-D. (ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 301–324.
- Gomori, G. (1952) *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. Chicago University Press, Chicago.
- Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B.F., Burger, G., Hori, M. and Fujishima, M. (2005) Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospira* infection. *BBRC.*, 337, 1198–1205.
- Kamako, S-i. and Imamura, N. (2006) Effect of Japanese *Paramecium bursaria* extract on photosynthetic carbon fixation of symbiotic algae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 5, 136–141.
- Karakashian, M.W. (1975) Symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 29, 145–173.
- Karakashian, S.J. (1963) Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. *Physiol. Zool.*, 36, 52–68.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2005) Symbiotic *Chlorella* sp. of the ciliate *Paramecium bursaria* do not prevent acidification and lysosomal fusion of the host digestive vacuoles during infection. *Protoplasma*, 225, 191–203.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2006a) Timing of appearance of acidphosphatase activity in infection of the ciliate *Paramecium bursaria* by symbiotic alga *Chlorella vulgaris*. *Zool. Sci.*, 23, Abstract, p1161.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2006b) Effects of protein synthesis inhibitors on infection by symbiotic *Chlorella* in the host *Paramecium bursaria*. *Jpn. J. Protozool.*, 39 (1), Abstract, 92–93.
- Kodama, Y. and Fujishima, M. (2007) Infectivity of *Chlorella* species for the ciliate *Paramecium bursaria* is not based on sugar residues of their cell wall components, but on their ability to localize beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole in the early infection process. *Protoplasma*, 231, 55–63.
- Kodama, Y., Nakahara, M. and Fujishima, M. (2007) Symbiotic alga *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* shows temporary resistance to host lysosomal enzymes during the early infection process. *Protoplasma*, 230, 61–67.
- Meier, R. and Wiessner, W. (1989) Infection of algae-free *Paramecium bursaria* with symbiotic *Chlorella* sp. isolated from green paramecia. II. A timed study. *J. Cell Sci.* 93, 571–579.
- Pado, R. (1967) Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. II. Photosynthesis. *Acta Soc. bot. pol.*, 36, 97–108.
- Reisser, W. (1976) Die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen *Paramecium bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* spec. in der *Paramecium bursaria*-symbiose. I. Der Stickstoff- und der Kohlenstoff-Stoffwechsel. *Arch. Microbiol.*, 107, 357–360.
- Reisser, W. (1986) Endosymbiotic associations of freshwater protozoa and algae. *In: Progress in Protistology*. Vol. 1. Corliss, J.O. and Patterson, D.J. (eds.). Biopress Limited, Bristol England, pp. 195–214.
- Reisser W (1992) Endosymbiotic associations of algae with freshwater protozoa and invertebrates. *In: Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Vol.1.1. Reisser, W. (ed.). Biopress Limited, Bristol England, pp. 1–19.
- Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S. and Usuki, I. (1998) Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria* – Does infectivity depend upon sugar components of the cell wall? *Eur. J. Protistol.* 34, 133–137.
- Tonooka, Y. and Watanabe, T. (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Eur. J. Protistol.*, 38, 55–58.
- Weis, D.S. (1984) The effect of accumulated time of separate cultivation on the frequency of infection of aposymbiotic ciliates by symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.*, 31, 13A.
- 山本友子, 高屋明子 (2006) 感染症における細胞食の役割; 細菌がマクロファージによる食食と殺菌を回避するしくみ 蛋白質 核酸 酵素, 51, 118–124.